

⑬ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 659 982

⑫ N° d'enregistrement national : **90 03726**

⑤ Int Cl^s : C 12 Q 1/37//C 12 Q 1/37)(C 12 R 1/72)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 23.03.90.

③ Priorité :

④ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 27.09.91 Bulletin 91/39.

⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦ Demandeur(s) : Société à responsabilité limitée dite:
SERBIO — FR.

⑧ Inventeur(s) : Lepargneur Jean-Pierre, Pussard née
Contant Geneviève, Martinoli Jean-Luc et Quentin
Gérard.

⑨ Titulaire(s) :

⑩ Mandataire : S.A. Fedit-Loriot & Autres Conseils en
Propriété Industrielle.

⑪ Utilisation de substrats chromogènes dans la détermination de Candida.

⑫ La présente invention a trait à une nouvelle utilisation
d'un substrat chromogène pour la détermination de sou-
ches de Candida et de souches apparentées appartenant à
l'ensemble des Torulopsis, ladite utilisation étant caractéri-
sée en ce que ledit substrat chromogène est choisi parmi
l'ensemble comprenant les substrats chromogènes sensi-
bles aux aminoamidases ou aminopeptidases.

Elle concerne également un procédé d'identification des-
dites souches ainsi que le nécessaire d'identification ren-
fermant au moins un desdits substrats chromogènes.

Pour identifier spécifiquement les souches de Candida
albicans, on préconise de faire appel à un substrat choisi
parmi H-L-Pro-pNA et ses sels d'addition.

FR 2 659 982 - A1



UTILISATION DE SUBSTRATS CHROMOGENES DANS LA DETERMINATION DE CANDIDA

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a trait à une nouvelle utilisation de substrats chromogènes du type monoamino-acide ou peptidique dans la détermination, le dosage et/ou l'identification de souches de Candida et de
5 souches apparentées appartenant à l'ensemble des Torulopsis.

ART ANTERIEUR

Les candidoses sont provoquées par des souches pathogènes de Candida ou de souches apparentées appartenant principalement à l'ensemble des Torulopsis. On sait
10 que, dans plus de 60 % des cas rencontrés, les souches de Candida responsables des candidoses appartiennent à l'espèce Candida albicans et que dans les autres cas les autres souches responsables appartiennent aux autres
15 espèces de Candida, par exemple Candida tropicalis, Candida krusei ou à l'ensemble des souches apparentées de Torulopsis, notamment l'espèce Torulopsis glabrata.

On sait que, pour pallier les difficultés (nombre important de manipulations et longues durées
20 d'essais) des techniques antérieures [test de blastèse (ou test de filamentation en sérum), test de chlamydo-population sur milieux PCB ou RAT] pour l'identification de souches de Candida, principalement les souches de

l'espèce *Candida albicans*, et des souches apparentées, on a proposé des techniques connues dans le domaine biochimique pour détecter des enzymes caractéristiques de levures, telles que les osidases et aminopeptidases, et
5 faisant appel à des substrats chromogènes ou fluorogènes.

Jusqu'à présent, toutes les techniques d'identification de *Candida* et de *Torulopsis* par détection d'osidases ou d'aminopeptidases ont été réalisées sur
10 des souches préalablement isolées.

On connaît en particulier de D.G. BOBEY et al., J. Clin. Microbiol., 13, (No. 2), pages 393-394, (1981), de J.L. PERRY et al., J. Clin. Microbiol., 25, (No. 12), pages 2424-2425, (1987) et de C.M. SMITKA et al., J.
15 Clin. Microbiol., 27 (No. 1), pages 203-206, (1989), des essais de substrats osidiques marqués par le reste fluorogène 4-méthylumbelliféryle (en abrégé 4MU), à savoir notamment les 4MU- β -D-glucopyranoside, 4MU-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside, 4MU- β -D-galactopyranoside et, respectivement, 4MU-2-acétamido-2-désoxy-
20 β -D-galactopyranoside, en vue de la détection de β -D-glucosidase, N-acétyl- β -D-glucosaminidase, β -D-galactosidase et, respectivement, N-acétyl- β -D-galactosaminidase provenant de souches de *Candida*. Selon ces documents,
25 il se trouve que les souches de *Candida* et de *Torulopsis* ne présentent aucune activité β -D-galactosidase, β -L-fucosidase et β -D-glucosidase; par contre les souches de *Candida albicans* et quelques souches de *Candida tropicalis* présentent une activité N-acétyl- β -D-galactosaminidase. Il est clair que l'utilisation de ces
30 substrats pris isolément n'est pas directement applicable à l'identification de souches de *Candida albicans* dans un mélange de souches de *Candida* et le cas échéant de *Torulopsis*.

On connaît également de M.CASAL et al., Mycopathologia 81, pages 155-159, (1983) et de I.POLACHEK et al., J. Clin. Microbiol., 25, pages 907-910, (1987) l'utilisation de substrats osidiques comportant un
5 groupe fluorogène ou chromogène tel que p-nitrophényle (en abrégé : PNP), β -naphthyle ou 6-bromo- β -naphthyle [obtenus par couplage (selon la formation d'un pont éther) d'un ose avec le p-nitrophénol, le β -naphthol ou
10 respectivement le 6-bromo- β -naphthol], pour la détermination de souches isolées de *Candida albicans*. Selon l'enseignement de ces deux documents, lesdits substrats osidiques réagissent avec leur osidase cible provenant des souches de *Candida* et des souches apparentées. Toutefois, il convient de remarquer que (i) le substrat
15 β -naphthyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide [enzyme cible : N-acétyl- β -D-glucosaminidase] donne la même réaction positive avec notamment les souches isolées de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea* et *Torulopsis glabrata*, et (ii) le substrat (6-bromo- β -
20 naphthyl)- β -D-glucopyranoside [enzyme cible : β -D-glucosidase] donne la même réaction positive avec les souches isolées de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Torulopsis glabrata* et *Cryptococcus neoformans*. En d'autres termes, l'utilisation de ces
25 substrats ne peut pas être directement appliquée à la détermination de *Candida albicans* dans un mélange contenant d'autres levures telles que les *Candida* et *Torulopsis*.

En ce qui concerne l'utilisation de substrats
30 monoaminoacides ou peptidiques sensibles aux amidases et notamment aux aminopeptidases dans le domaine de l'identification de souches de *Candida* et apparentées, on connaît deux solutions techniques.

La première solution représentée par le test
35 commercialisé sous la dénomination YEAST-IDENT™ s'ap-

plique à des souches de levure préalablement isolées; la méthode d'identification repose sur la détermination en milieu liquide du profil enzymatique de la souche isolée, ledit profil étant obtenu au moyen d'un système
5 d'une vingtaine de substrats différents après 4 h d'incubation à 37°C. Lesdits substrats, qui comportent un groupe fluorogène tel que β -naphtylamino (en abrégé : NA) sont notamment les H-Gly-NA, H-L-Pro-NA, H-L-Trp-NA, H-L-Hyp—NA, H-L-Ile-NA, H-L-Val-NA, H-L-Leu-Gly-NA, H-
10 L-His-NA, H-L-Cys-NA, H-L-Tyr-NA et H-Gly-Gly-NA. Avec de tels substrats, l'interprétation est délicate. Comme ces substrats sont spécifiques d'enzymes appartenant à de nombreuses souches de levures et en particulier de *Candida*, il faut tenir compte de l'ensemble de tous les
15 résultats obtenus avec tous les substrats pour apprécier le profil enzymatique d'une souche isolée donnée de *Candida*. L'utilisation de cette solution technique n'est pas directement transposable aux mélanges de souches, en effet le substrat particulier H-L-Pro-NA donne une
20 réaction positive avec les souches isolées de *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida rugosa*, *Candida zeylanoides* et *Torulopsis candida*.

25 La seconde solution décrite dans le résumé de R.W. KELLEY et al. paru dans Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., C 337, page 384 (1986) et dans l'article de J.L. PERRY et al., J. Clin. Microbiol., 28 (No 3), pages 614-615 (mars 1990) concerne l'utilisation du substrat
30 H-L-Pro-NA précité dans l'identification de *Candida albicans* et/ou *Candida tropicalis*. Plus précisément, ledit résumé C 337 signale la possibilité de distinguer les souches de *Candida albicans* des souches de *Candida tropicalis* et propose à cet effet deux substrats, à
35 savoir : le PNP-N-acétyl- β -D-galactosaminide et le H-L-

Pro-NA. Cependant, ce résumé ne décrit la méthode qui permet de réaliser la distinction *Candida albicans*/*Candida tropicalis* ni n'indique si ladite méthode s'applique à des mélanges de souches. L'article de J.L. PERRY et al. préconise l'utilisation simultanée de ces deux substrats dans une même réaction d'identification en phase liquide à partir de souches préalablement isolées sur milieu gélosé standard.

On sait de l'article de J.KUNERT, et al., Journal of Medical and Veterinary Mycology 26, pages 187-194, (1988) que des substrats chromogènes comportant une chaîne monoaminoacide ou peptidique et dans lesquels le reste chromogène est le radical p-nitroanilino (en abrégé : pNA) ont été étudiés en vue de caractériser les enzymes protéolytiques extracellulaires de souches isolées de dermatophytes. Cet article cite notamment le substrat H-L-Pro-pNA mais ne concerne pas l'identification des *Candida*, qui ne font pas partie de l'ensemble des dermatophytes, ni ne suggère l'utilisation dudit substrat pour la détermination de diverses souches de *Candida*, telles que celles de *Candida albicans*, dans un mélange de *Candida* et de souches apparentées.

SOLUTION DE L'INVENTION

On propose suivant l'invention une nouvelle solution technique qui met en oeuvre des substrats chromogènes pour la détermination de *Candida* et *Torulopsis* et qui est applicable à l'identification de ces souches, principalement les plus usuelles, telles que les *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* et *Torulopsis glabrata* (qui peuvent être pathogènes) parmi d'autres souches : *Candida guilliermondii*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, etc (qui sont peu pathogènes ou non pathogènes).

Plus précisément, cette nouvelle solution repose, dans l'identification de souches de *Candida albicans*

dans un mélange de souches de *Candida* et de souches apparentées de l'ensemble des *Torulopsis*, sur (i) l'utilisation d'un système de substrats chromogènes et (ii) l'utilisation d'un système de moyens inhibiteurs.

5 Cette solution technique offre l'avantage
d'identifier parmi les *Candida* et *Torulopsis* (i) les
souches de *Candida albicans*, qui comprennent principale-
ment les levures pathogènes que l'on rencontre le plus
souvent chez l'homme, (ii) les souches de *Candida*
10 *tropicalis* et de *Torulopsis glabrata*, qui sont notamment
responsables de vaginites, endocardites, pneumonies et
septicémies, et (iii) les souches de *Candida krusei* et
Candida guilliermondii que l'on peut rencontrer le cas
échéant chez l'homme.

15 **BUT DE L'INVENTION**

20 Selon un premier aspect de l'invention, on propose une nouvelle utilisation de substrats chromogènes pour la détermination de souches de *Candida* et *Torulopsis*, notamment celles que l'on rencontre le plus fréquemment chez l'homme telles que *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* et *Candida guilliermondii*.

Selon un second aspect de l'invention, on propose l'utilisation d'un système de substrats chromogènes pour identifier dans un mélange de *Candida* et *Torulopsis* les souches que l'on rencontre le plus souvent chez l'homme et qui sont notamment pathogènes, afin de distinguer principalement les *Candida albicans*, d'une part, et les *Torulopsis glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* et *Candida guilliermondii*, d'autre part.

Selon un autre aspect de l'invention, on propose un procédé d'identification des souches de Candida et Torulopsis les plus fréquentes chez l'homme au moyen de substrats chromogènes spécifiques et d'un système de moyens inhibiteurs, ce procédé étant directement appli-

cable pour la détermination de souches non isolées de *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* et *Candida guilliermondii*.

OBJET DE L'INVENTION

5 Le but de l'invention et d'autres avantages sont obtenus par les caractéristiques données ci-après.

 En premier lieu, on préconise une nouvelle utilisation d'un substrat chromogène pour la détermination de souches de *Candida* et de souches apparentées appartenant à l'ensemble des *Torulopsis*, ladite utilisation
10 étant caractérisée en ce que ledit substrat chromogène est choisi parmi l'ensemble comprenant les substrats chromogènes sensibles aux aminoamidases ou aminopeptidases.

15 En second lieu, on préconise une nouvelle utilisation de substrats chromogènes pour la détermination de *Candida*, notamment de souches de *Candida albicans*, et de *Torulopsis* qui fait appel à un système de substrats chromogènes, d'une part, et un système de moyens inhibi-
20 teurs, d'autre part, pour l'identification des principales souches responsables des infections du type candidose que l'on rencontre en particulier chez l'homme.

 Selon un autre aspect de l'invention, on propose un procédé pour l'identification de levures appartenant
25 à l'ensemble des souches de *Candida* et des souches apparentées de *Torulopsis*, ledit procédé étant caractérisé en ce que

 (a) on met en contact un échantillon de levures avec (i) au moins un substrat chromogène sensible à au
30 moins un enzyme appartenant à l'ensemble les aminoamidases et aminopeptidases, et (ii) au moins un moyen inhibiteur choisi parmi l'ensemble comprenant notamment les substances antibactériennes, les substances antifongiques et leurs mélanges, en présence d'une source d'azo-

te, d'une source de carbone et, le cas échéant, d'oligoéléments, et

(b) on incube puis observe [pendant au moins 1 h, en milieu liquide, ou pendant au moins 12 h en milieu solide (notamment gélosé)] la cinétique du clivage dudit substrat par la formation de couleur résultant dudit clivage.

Selon encore un autre aspect, on préconise un procédé d'identification de souches non isolées de Candida et de Torulopsis pour distinguer principalement les souches de Candida albicans et subsidiairement les souches de Torulopsis glabrata, Candida tropicalis, Candida krusei et Candida guilliermondii, ledit procédé mettant en oeuvre un système d'un ou plusieurs substrats chromogènes et d'un ou plusieurs moyens inhibiteurs.

On préconise enfin selon l'invention un nécessaire, kit ou trousse de dosage pour l'identification desdites souches de Candida albicans, Torulopsis glabrata, Candida tropicalis, Candida krusei et Candida guilliermondii, ledit nécessaire comportant au moins un desdits substrats chromogènes, et le cas échéant, un ou plusieurs milieux de culture appropriés et au moins un moyen inhibiteur.

ABREVIATIONS

Dans la présente description, on a utilisé les abréviations suivantes par commodité :

- pour les restes d'acide aminé

Aib	= 2-aminoisobutyryle (ou 2-méthylalanyle)
Ala	= α -alanyle
Arg	= arginyle
ATC	= thiazolidine-4-carbonyl (ou thiopropyl)
Abu	= 2-aminobutyryle
CHA	= 3-cyclohexylalanyle

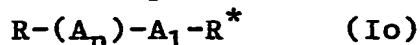
	CHG	= α -cyclohexylglycyle
	CHT	= 3-(4-hydroxycyclohexyl)alanyle
	Cys	= cystéyle
	Gly	= glycyle
5	His	= histidyle
	Hyp	= hydroxyprolyle (i.e. 3Hyp ou 4Hyp)
	3Hyp	= 3-hydroxyprolyle (ou 3-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyle)
	4Hyp	= 4-hydroxyprolyle (ou 4-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyle)
10	Ile	= isoleucyle
	INC	= isonipécotyle [ou (pipéridin-4-yl)carbonyle]
	Leu	= leucyle
15	Lys	= lysyle
	MeGly	= N-méthylglycyle (ou sarcosyle)
	Nle	= norleucyle
	Nva	= norvalyle
	ONC	= 2-oxonipécotyle [ou (2-oxo-pipéridin-3-yl)carbonyle]
20	Orn	= ornithinyle
	Phe	= phénylalanyle
	Phg	= phénylglycyle
	Pip	= pipécolinoyle
25	Pro	= prolyle
	Ser	= séryle
	Thr	= thréonyle
	Trp	= tryptophanyle
	Tyr	= tyrosyle
30	Val	= valyle
	<u>- pour les autres abréviations :</u>	
	AcOH	= acide acétique
	Adoc	= adamantyloxycarbonyle
	Aoc	= t-amyloxycarbonyle
35	Boc	= t-butyloxycarbonyle

	(6-Br)NA	= 6-bromo- β -naphtylamino
	Bu	= n-butyle
	Bz	= benzoyle
	Cbo	= carbobenzoxo
5	Et	= éthyle
	EM	= éthyloxymalonyl (ou EtO-CO-CH ₂ -CO)
	Fmoc	= 9-fluorènylméthoxy-carbonyl
	Foc	= furfuryloxycarbonyl
	HTFA	= acide trifluoroacétique
10	Iboc	= isobornyloxycarbonyl
	iPr	= isopropyle
	Me	= méthyle
	MeO	= méthoxy
	(4-MeO)NA	= 4-méthoxy- β -naphtylamino
15	MM	= méthyloxymalonyl (ou MeO-CO-CH ₂ -CO)
	4MU	= 4-méthylumbelliféryle
	NA	= β -naphtylamino
	ONP	= o-nitrophényl
	PCB	= milieu de culture pomme de terre-carot- te-bile
20	PEG	= polyéthylèneglycol
	pH	= cologarithme de la concentration en ions H ⁺
	PM	= poids moléculaire
	pNA	= p-nitroanilino [ou (4-NO ₂)C ₆ H ₄ NH]
25	PNP	= p-nitrophényl
	Pr	= propyle
	RAT	= milieu de culture riz-agar-tween
	RT	= température ambiante (15-20°C)
	tBu	= t-butyle
30	Tos	= p-toluènesulfonyl (ou tosyl)
	TTC	= chlorure de 2,3,5-triphényl-2H-tétrazo- lium (ou rouge de tétrazolium)

	YNB	= source d'azote commercialisée sous la nomenclature commerciale de "YEAST NITROGEN BASE"
	Z	= benzyloxycarbonyle
5	Z(p-Cl)	= p-chlorobenzyloxycarbonyle
	Z(p-OMe)	= p-méthoxybenzyloxycarbonyle.
	<u>- pour les notations des coloration et fluorescence :</u>	
	-	= néant
	+	= faible
10	++	= moyenne
	+++	= intense
	++++	= très intense.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

15 Les substrats chromogènes et leurs sels d'addition utiles suivant l'invention, qui présentent en général une plus grande sensibilité que les substrats fluorogènes (présence d'un groupe NA éventuellement substitué) vis-à-vis des souches de Candida et Torulopsis, 20 peuvent être représentés par la formule générale



dans laquelle

R représente l'atome d'hydrogène ou un groupe bloquant l'extrémité N-terminale,

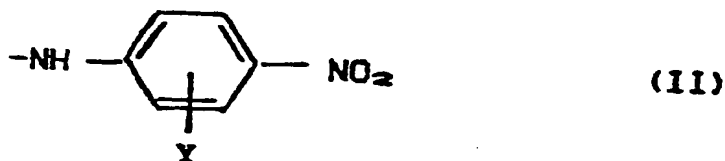
25 A_n représente une simple liaison, un reste monoaminoacide ou un reste peptidique pouvant comporter de 2 à 5 restes d'acide aminé,

A_1 représente un reste α -aminoacide choisi parmi l'ensemble constitué par Gly, MeGly, L-Arg, L-Lys, L-His, L-Pro, L-Hyp, L-Cys, L-Val et L-Trp; et, 30

R^* représente un reste chromogène aminé notamment choisi parmi l'ensemble comprenant le reste p-nitroanilino et les reste p-nitroanilino où le groupe phényle est substitué.

Les sels d'addition suivant l'invention sont essentiellement des sels d'addition d'acide obtenus par réaction d'un composé de formule I avec un acide minéral ou organique, notamment HCl, HBr, AcOH ou HTFA.

Le groupe chromogène R^* qui convient d'une manière générale à la détermination quantitative des enzymes protéolytiques aminoamidases et aminopeptidases répond à la formule



dans laquelle Y est H, Br, Cl, F, CF_3 , COOH, COOW, $CONH_2$, CONHW, $CONW_2$, $CONH(CH_2)_mNMe_2$, $HOSO_2$, CN, OH ou OW, où W est un groupe alkyle en C_1-C_6 , aryle en C_6-C_{10} , aralkyle en C_7-C_{11} ou alicyclique en C_3-C_8 et m est un nombre entier ayant pour valeur 1 à 10.

De tels groupes de formule II où le noyau phényle du groupe pNA est substitué sont notamment décrits dans le document EP-A-O 110 306. Parmi ces groupes on peut notamment citer les groupes utiles suivant l'invention : pNA, 2-carboxy-4-nitroanilino et 3-carboxy-4-nitroanilino, 2-halogéno-4-nitroanilino et 3-halogéno-4-nitroanilino (où l'halogène est F, Cl ou Br), 2-méthoxy-5-méthyl-4-nitroanilino, 2-hydroxysulfonyl-4-nitroanilino, 4-trifluorométhyl-2-nitroanilino, 4-trifluorométhyl-3-nitroanilino, 4-cyano-2-nitroanilino, et analogues. Le groupe R^* préféré suivant l'invention est pNA.

Le reste R représente H ou un groupe protecteur de l'extrémité N-terminale. Un tel groupe protecteur est bien connu dans la technique, par exemple un des restes bloquants l'extrémité N-terminale de peptides tels que
5 décrits dans EP-A-O 110 306, US-A-4 480 030, FR-A-2 293 439 et US-A-4 440 678. Parmi les groupes R, qui sont différents de H, on peut notamment signaler les groupes alkyle en C_1-C_4 (notamment Me, Et, Pr, iPr, Bu, tBu), aryle éventuellement substitué (notamment Ph, tolyle,
10 xylyle, chlorophényle, trifluorométhylphényle, méthoxyphényle), aralkyle éventuellement substitué (notamment Bzl, chlorobenzyle, dichlorobenzyle, trifluorométhylbenzyle, difluorobenzyle, méthoxybenzyle, éthoxybenzyle, 3,4-méthylènedioxybenzyle) et les groupes protecteurs
15 classiques de l'extrémité N-terminale de peptides [notamment Ac, Tos, Adoc, Aoc, Bz, Cbo, Fmoc, Foc, Iboc, Z, Z(p-Cl) et Z(p-OMe)].

Convienient également les restes R choisis parmi l'ensemble constitué par (a) un reste oxymalonyl de
20 formule $R_1-O-CO-CH_2-CO$, où R_1 est un groupe alkyle en C_1-C_4 , un groupe phényle, un groupe phényle substitué par un ou plusieurs groupes Me, MeO, Cl, Br, F, CF_3 , un groupe cycloalkyle en C_3-C_6 , un groupe benzyle, un groupe benzyle substitué par un ou plusieurs groupes Me,
25 MeO, Cl, Br, F, CF_3 , ou un groupe cycloalkylméthyle où le fragment cycloalkyle est en C_3-C_6 , et (b) un reste de polyéthylèneglycol de formule $R_2-O(CH_2CH_2O)_n-CO$, où R_2 est un groupe alkyle en C_1-C_6 , phényle ou benzyle et n est un nombre entier ayant pour valeur 1 à 170.

30 D'une manière générale, on préfère suivant l'invention les substrats où R est H car, à l'exception de quelques cas particuliers notamment pour les *Candida guilliermondii* et *Torulopsis glabrata*, la présence d'un groupe bloquant l'extrémité N-terminale diminue la ciné-

tique du clivage par les aminoamidases ou les aminopeptidases.

Parmi les substrats chromogènes inclus dans la formule Io peuvent être mentionnés les substrats

5 $R-A_1-R^*$ (I_1)

$R-A_2-A_1-R^*$ (I_2)

$R-A_3-A_2-A_1-R^*$ (I_3)

$R-A_4-A_3-A_2-A_1-R^*$ (I_4)

et leurs sels d'addition

10 où R, A_1 et R^* sont définis comme indiqués ci-dessus et A_2 , A_3 , A_4 représentent chacun un reste aminoacide.

Ici, contrairement à la nomenclature classique des chaînes peptidiques, les restes d'acide aminé des substrats chromogènes suivant l'invention sont numérotés 1, 2, 3, etc... à partir de l'extrémité CO-terminale et non à partir de l'extrémité N-terminale.

Quand A_n est un reste monoaminoacide (voir pour illustration la formule I_2), il représentera avantageusement Gly, L-Pro, L-Hyp, L-ONC, L-Phg ou L-ATC.

20 Quand A_n est un reste dipeptidique (voir pour illustration la formule I_3), le reste aminoacide en position 2 (i.e. A_2) sera avantageusement Gly, L-Pro, L-Hyp, ou L-Phg, et le reste aminoacide de l'extrémité N-terminale en position 3 (i.e. A_3) sera avantageusement
25 Gly, D-Pro, L-Pro, D-Hyp, L-Hyp, D-Leu, L-Leu, D-Ala, L-Ala, D-Val, L-Val, D-ONC, L-ONC ou INC.

Quand A_n est un reste tripeptidique (voir pour illustration la formule I_4), le reste aminoacide en position 2 (i.e. A_2) sera avantageusement Gly, L-Pro, L-Hyp, L-Thr ou L-Phg, le reste aminoacide en position 3 (i.e. A_3) sera avantageusement Gly, L-Pro, L-Hyp, L-Leu, L-Ala, L-Ser ou L-Val, et le reste aminoacide de l'extrémité N-terminale (i.e. A_4) sera avantageusement
30 Gly, D-Pro, L-Pro, D-Hyp, L-Hyp, D-Leu, L-Leu, D-Ala, L-Ala, D-Val, L-Val, D-ONC, L-ONC ou INC.
35

D'une façon avantageuse, A_n ne comportera suivant l'invention aucun reste CHA ou CHT.

Les substrats les plus intéressants suivant l'invention sont en général ceux dans lesquels A_n est
5 une simple liaison, un reste monoaminoacide, dipeptidique ou encore tripeptidique.

De façon avantageuse suivant l'invention A_1 sera L-Pro, L-Hyp, L-Arg ou L-Lys, et mieux L-Pro ou L-Arg.

En pratique, le reste aminoacide de l'extrémité
10 CO-terminale du substrat chromogène suivant l'invention sera toujours de configuration L; le reste aminoacide en position 2 sera un reste dépourvu d'atome de carbone asymétrique, tel que Gly, ou un reste α -aminoacide de configuration L; le reste aminoacide de l'extrémité N-
15 terminale en position supérieure à 2 sera un reste dépourvu d'atome de carbone asymétrique, tel que Gly, ou un reste α -aminoacide de configuration D ou L; et, les éventuels restes aminoacides présents entre la position 2 et le reste aminoacide de l'extrémité N-terminale
20 seront soit dépourvus d'atome de carbone asymétrique, soit de configuration L.

On a consigné dans les tableaux I à V ci-après un certain nombre de substrats chromogènes susceptibles d'être utilisés suivant l'invention qui ont été testés
25 vis-à-vis de plusieurs souches. Les résultats consignés dans les tableaux I-IV ont été obtenus à partir d'un milieu de culture tamponné à pH 6,0 comprenant une source d'azote (YNB; 6,7 g/l), du glucose (20 g/l), de l'agar (20 g/l), un antibiotique (gentamicine; 0,05 g/l)
30 et le substrat à étudier. Le tableau I relatif à diverses souches de Candida fait également état d'essais comparatifs avec des substrats fluorogènes de l'art antérieur.

Ces tableaux montrent que, d'une manière générale, tous les substrats de formule I_1 , I_2 , I_3 et I_4 , où R est H, sont hydrolysables par les aminoamidases et les aminopeptidases des souches de *C.tropicalis*.

TABEAU I
ESSAIS DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE SOUCHES DE CANDIDA

Substrat	Lecture à 24 h	Spécificité
H-L-Pro-pNA, AcOH	++++	(a)
H-L-4Hyp-pNA, AcOH	+++	(a)
H-L-3Hyp-pNA, AcOH	+++	(a)
H-L-Arg-pNA, 2AcOH	+++	(a)
Cbo-L-Arg-pNA, AcOH	-	
Z-L-Lys-pNA, AcOH	-	
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₇ CO-L-Arg-pNA, AcOH	-	
Cbo-L-Pro-pNA	-	
H-L-Ala-L-Pro-pNA, AcOH	++	(a)
Z-L-Ala-L-Pro-pNA	-	
Z-Gly-L-Pro-pNA	-	
H-L-Ala-L-Ala-L-Pro-pNA, AcOH	+ (à 48 H)	(a)
H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++	(b), (c)
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	++++	(b), (d)
Boc-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	++	(b), (d), (e)
H-L-4Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++	(b)
Boc-L-4Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	++++	(b)
H-Gly-L-Pip-L-Arg-pNA, 2AcOH	++	(b)

TABLEAU I (fin)
ESSAIS DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE CANDIDA ALBICANS

Substrat	Lecture à 24 h	Spécificité
Tos-Gly-L-Pip-L-Arg-pNA, AcOH	-	(b)
H-L-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	+++	(b)
H-L-ATC-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++	(a)
H-L-Pro-NA, AcOH (f)	++	
H-L-Pro-(4-MeO)NA, AcOH (f)	-	(a)
H-L-Pro-(6-Br)NA, AcOH (f)	+	(a)
H-L-Hyp-NA, AcOH (f)	++	
Notes (a) : non spécifique des souches de Candida albicans (b) : interférence avec C. tropicalis (c) : interférence avec C. krusei (d) : interférence avec C. guilliermondii (e) : interférence avec T. glabrata (f) : substrat de l'art antérieur pour comparaison		

TABLEAU II

ESSAIS DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE CANDIDA TROPICALIS

Substrat	Lecture à 24 h
H-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++
H-L-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++
H-D-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++
H-D-Pro-D-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	-
MM-L-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	+
H-L-Hyp-L-Arg-pNA, 2AcOH	++
H-L-Hyp-L-Lys-pNA, 2AcOH	++
H-L-Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	+++
H-L-Hyp-L-Hyp-L-Arg-pNA, 2AcOH	+++
H-D-Pro-L-Hyp-L-Arg-pNA, 2AcOH	+++
H ₂ NCO-L-Pro-D-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	-
H ₂ NCO-D-Leu-Gly-L-Arg-pNA, AcOH	++++
H-L-Leu-Gly-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++
H-L-ONC-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	+++
H-INC-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	+++
H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++

TABEAU III
COMPARAISON DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE C. TROPICALIS ET T. GLABRATA

Substrat	T. GLABRATA (a)	C. TROPICALIS (a)
EM-Gly-L-Arg-pNA, AcOH	-	++
EM-L-Phg-L-Arg-pNA, AcOH	++++	+++
EM-L-Phe-L-Arg-pNA, AcOH	-	-
EM-L-Tyr-L-Arg-pNA, AcOH	-	-
EM-L-Hyp-L-Arg-pNA, AcOH	- (b)	++ (b)
EM-L-ATC-L-Arg-pNA, AcOH	- (b)	- (c)
H-D-Pro-L-Phg-L-Arg-pNA, 2AcOH	-	++
H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	-	+++
Boc-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	+++	+
Boc-L-Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	-	+
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	+	+
H-Gly-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	+	+
H-D-Pro-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	+	+
MM-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	-	+

TABLEAU III (fin)
COMPARAISON DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE C.TROPICALIS ET T.GLABRATA

Substrat	T.GLABRATA (a)	C.TROPICALIS (a)
H ₂ NCO-D-Leu-Gly-L-Arg-pNA, AcOH	+	++
H ₂ NCO-L-Leu-Gly-L-Arg-pNA, AcOH	-	+++ (c)
BzNH-L-Ala-Gly-L-Arg-pNA, AcOH	-	+++
BzNH-D-Ala-Gly-L-Arg-pNA, AcOH	-	++
MM-L-Phg-L-Arg-pNA, AcOH	++++	++
Notes		
(a) : lecture à 24 h (b) : +++ avec lecture à 48 h (c) : ++++ avec lecture à 48 h		

TABEAU IV
ESSAIS DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE CANDIDA KRUSEI

Substrat	Lecture à 24 h	Spécificité
H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++++	(a)
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	-	(c) (e)
Boc-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	-	(b) (f)
H-L-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	-	(a)
H-Gly-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH	++	(d)
H-L-ONC-L-Arg-pNA, AcOH	++	(e)
MM-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	+++	(d)
Notes	(a) : interférence avec C.tropicalis (++++) (b) : interférence avec C.tropicalis (+++) (c) : interférence avec C.tropicalis (++) (d) : interférence avec C.tropicalis (+) (e) : interférence avec C.guilliermondii (++++) (f) : interférence avec T.glabrata(++)	

TABLEAU V
ESSAIS DE SUBSTRATS VIS-A-VIS DE CANDIDA GUILLERMONDII

Substrat	Lecture à 24 h	Spécificité
H-L-Pro-pNA, AcOH	+++	(a)
H-L-ONC-L-Arg-pNA, AcOH	+++	(b)
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, AcOH	+++	(c)
Boc-L-Leu-L-Ser-L-Thr-L-Arg-pNA, AcOH	+++	(c)
Notes	(a) : interférence avec C.albicans (++++) (b) : interférence avec C.krusei (++) (c) : interférence avec C.tropicalis (++)	

Les substrats chromogènes consignés dans les tableaux I-V ci-dessus et les tableaux donnés plus loin ont été préparés selon les méthodes classiques de la synthèse peptidique, notamment celles décrites dans
 5 l'art antérieur précité et la demande française n° 90 01965 du 19 février 1990 de la Demanderesse.

Le tableau I confirme que, pour identifier les souches de Candida, des substrats qui conviennent suivant l'invention sont choisis parmi l'ensemble
 10 constitué par les composés de formule



où R, A_1 et R^* sont définis comme indiqué ci-dessus (notamment H-L-Pro-pNA et H-L-Hyp-pNA), et les composés de formules :

15 H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,
 Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,
 H-L-4Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA,
 Boc-L-4Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA,

et leurs sels d'addition.

20 Les substrats que l'on préfère suivant l'invention pour l'identification des souches de Candida albicans seront choisis parmi l'ensemble constitué par le composé de formule I_1 où A_1 est L-Pro, R est H et R^* est pNA, et ses sels d'addition.

25 Pour la détermination des souches de T.glabrata l'on recommande de faire appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formule I_2 ou I_3 où A_1 est L-Arg, A_2 est L-Pro ou L-Phg, A_3 est Gly, et R est différent de H, et leurs sels d'addition.

30 Parmi les substrats utiles pour la détermination des souches de T.glabrata, on préfère, suivant l'invention, les EM-L-Phg-L-Arg-pNA, MM-L-Phg-L-Arg-pNA, Boc-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA et leurs sels d'addition.

Pour l'identification des souches de *C.krusei* l'on préconise de faire appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formule I₃ où A₁ est L-Arg, A₂ est L-Pro, A₃ est Gly, et R est H, EM ou MM, et leurs sels d'addition.

Parmi les substrats qui conviennent pour l'identification des souches de *C.krusei*, les préférés sont: H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, MM-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA et leurs sels d'addition.

Suivant l'invention, pour identifier les souches de *C.guilliermondii*, l'on fera de préférence appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formule :

H-L-Pro-pNA,
H-L-Arg-pNA,
H-L-ONC-L-Arg-pNA,
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,
Boc-L-Leu-L-Ser-L-Thr-L-Arg-pNA, et
leurs sels d'addition.

Enfin suivant l'invention, pour la détermination des souches de *C.tropicalis* l'on fera avantageusement appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formules I₁, I₂, I₃ et I₄ où A₁, A₂, A₃ et A₄ sont définis comme indiqué ci-dessus, et R est différent de H, et leurs sels d'addition.

Il se trouve que les substrats de formule I₁, qui comportent comme aminoacide A₁ un reste L-Arg, L-Trp, L-Val, L-His ou L-Cys et qui sont hydrolysés par les souches de *Candida albicans*, sont en général également hydrolysés par plus de 90 % des souches de *T.glabrata*, *C.krusei*, et *C.tropicalis* (qui sont susceptibles d'être pathogènes). En revanche, on a observé suivant l'invention que les substrats de formule I₁, où A₁ est L-Pro ou L-Hyp, et R est H, sont plus spécifiques des *C.albicans* dès lors qu'ils ne sont hydrolysés que par les *C.guil-*

lermondii, C.parapsilosis, C.zeylanoides et Tr.cutaneum (qui sont peu pathogènes ou non pathogènes).

On assure selon l'invention la spécificité du procédé d'identification en associant au substrat des inhibiteurs. En particulier, le cycloheximide incorporé au milieu de culture contenant le substrat de Candida albicans, inhibe la pousse de toutes les levures appartenant à l'ensemble des Candida et des Torulopsis qui interfèrent sur la spécificité du substrat de Candida albicans. Les quelques souches de Candida zeylanoides qui ne seraient pas inhibées par ledit cycloheximide peuvent être sélectivement inhibées en utilisant comme source de carbone le maltose, de préférence au glucose, pour assurer l'identification des Candida albicans.

Pour la mise en oeuvre du procédé d'identification de l'invention, l'on ensemence un milieu nutritif contenant une source d'azote, une source de carbone et le cas échéant des oligo-éléments, d'une part, et au moins un inhibiteur choisi parmi l'ensemble comprenant les substances antibiotiques, d'autre part.

Parmi les inhibiteurs qui conviennent, on peut notamment mentionner les substances antibactériennes (telles que le chloramphénicol, la gentamicine, et analogues), les substances antifongiques (telles que le cycloheximide et analogues, qui, en présence d'un substrat spécifique de l'invention, tel que H-L-Pro-pNA, ne permettent que l'hydrolyse par les Candida albicans), pour éliminer les contaminants ou sélectionner les souches que l'on veut identifier. En d'autres termes, la présence d'une substance antifongique, telle que le cycloheximide et ses analogues, inhibe la pousse des levures comprenant notamment les Torulopsis et les autres Candida interférant sur la détermination de Candida albicans.

Le milieu de culture peut également comporter un colorant, notamment tel que la rhodamine (rhodamine 6G ou rhodamine B) à la concentration finale de 0,001-0,005 g/l, ou un colorant d'oxydo-réduction, notamment tel
5 qu'un sel de tétrazolium [rouge de tétrazolium (TTC) ou encore bleu de tétrazolium] à la concentration de 0,05-0,9 g/l.

Les colorants interviennent en tant que moyens inhibiteurs de la culture de certains Candida. En
10 particulier, la rhodamine, et notamment la rhodamine 6G, inhibe la pousse de C.tropicalis et le sel de tétrazolium n'est pas réduit par les souches de T.glabrata et de C.krusei.

La source d'azote sera avantageusement une peptone d'origine naturelle ou synthétique. Conviennent
15 notamment, selon l'invention, les produits désignés sous les dénominations commerciales de "YEAST NITROGEN BASE" (YNB) référence 0392, NEOPEPTONE référence 0119, PROTEOSE PEPTONE référence 0122, BACTO PEPTONE référence
20 0118 (fournis par la société dite DIFCO) et l'extrait de levure référence 64341 (fourni par l'INSTITUT PASTEUR). La peptone sera utilisée à la concentration de 4 à 15 g/l, et de préférence à la concentration de 10 g/l.

La source de carbone sera constituée par un
25 sucre, notamment le glucose ou le maltose, à la concentration de 10 à 40 g/l. Comme indiqué plus haut, le maltose qui permet la pousse des souches de Candida albicans offre l'avantage d'inhiber celle des souches de Candida zeylanoides.

Le milieu de culture pourra être solide et
30 comportera à cet effet 10 à 30 g/l d'agar. Conviennent par exemple les produits commercialisés sous les nomenclatures de BACTO AGAR référence 0140, CORN MEAL AGAR référence 0386, BITEK AGAR référence 0138 (fournis
35 par la société dite DIFCO).

Le milieu de culture pourra être tamponné à pH 4,5, à pH 5,0-5,5, et mieux à pH 6,0 (tampon acétate 0,1 M) ou à pH 8,0 (tampon Tris 0,1 M). Comme les souches de *Candida guilliermondii* se cultivent à un pH supérieur ou égal à 6 et mieux en milieu alcalin, on peut éliminer l'éventuelle interférence de *C.guilliermondii* sur la détermination de *C.albicans* en cultivant les souches de *C.albicans* isolées ou non-isolées à un pH de 4,5-5, dès lors que les souches de *C.albicans* sont en général résistantes dans les milieux acides de pH 4,5-5. Selon l'invention, il n'y a pas lieu de s'inquiéter de cette interférence quand on inhibe le développement des levures différentes de *C.albicans* au moyen de cycloheximide; il suffit alors d'opérer à pH 6,0 ou 8,0 en présence dudit cycloheximide.

Si nécessaire, on utilisera plusieurs substrats quand le mélange de souches non isolées est susceptible de comporter des souches de *C.tropicalis*. Ainsi l'interférence *C.tropicalis* / *T.glabrata* peut être visualisée en utilisant un premier substrat pour *T.glabrata* et un second substrat pour *C.tropicalis*, puis le cas échéant en étudiant la réduction de TTC par les seuls *C.tropicalis*, ou en inhibant la pousse des seuls *C.tropicalis* par la rhodamine 6G.

Pour l'identification des souches de *C.guilliermondii*, on utilisera plus avantageusement un milieu de culture tamponné à pH 8,0

Le meilleur mode de mise en oeuvre de l'invention consiste à :

(1) préparer un milieu de culture solide en incorporant dans 980 ml de tampon la peptone (10 g/l), le sucre (10 à 40 g/l), l'agar (10 à 30 g/l), homogénéiser le mélange résultant à RT, stériliser ledit mélange (notamment 0,25 h à 120-125°C), maintenir ledit mélange à 45-50°C après stérilisation pendant une durée

inférieure à 4 h, ajouter une composition du substrat en milieu tampon préalablement stérilisée par passage sur membrane filtrante, la concentration du substrat étant comprise entre 0,5 et 2 mM et de préférence égale à 1 mM (soit par exemple une concentration finale de 0,35 g du substrat H-L-Pro-pNA par litre de gélose), ajouter l'un au moins des inhibiteurs suivants préalablement stérilisés sur membrane :

- solution tamponnée de gentamicine (à la concentration finale de 0,03-0,06 g, de préférence 0,05 g par litre de gélose),

- solution tamponnée de sel de tétrazolium (de préférence TTC, à la concentration finale de 0,1 g par litre de gélose),

- solution de chloramphénicol (à la concentration finale de 0,25 g par litre de gélose),

- solution de cycloheximide (à la concentration finale de 0,1-0,5 g, de préférence 0,5 g par litre de gélose),

- solution de rhodamine 6G (à la concentration finale de 0,001-0,003 g par litre de gélose),

répartir le mélange résultant sous une forme convenable pour dosage (boîtes de Pétri, tubes, bandes ou autres), laisser refroidir ledit mélange conditionné pendant au moins 0,25 h à 20-25°C sous atmosphère stérile;

le produit ainsi obtenu est stocké à 12-15°C à l'abri de la lumière, il peut être placé dans des sacs ou poches appropriés, notamment plastiques pour empêcher toute évaporation;

(2) ensemercer le milieu de culture ainsi conditionné avec une colonie de souche isolée ou d'un mélange de souches à étudier (l'ensemencement peut être réalisé soit par dépôt, soit par stries, soit encore par étalement), ladite colonie étant émulsifiée dans de l'eau distillée ou du sérum physiologique;

(3) incuber le milieu de culture à une température comprise entre RT et 40°C (de préférence à 37°C) pendant au moins 18 h, à un pH supérieur ou égal à 4,5 et mieux compris entre 6,0 à 8,0;

5 (4) observer visuellement la réaction obtenue.

L'incubation aura en général une durée inférieure à 48 h. De préférence, ladite incubation sera réalisée à 37°C sur milieu solide gélosé pendant 20-30 h et mieux pendant 24 h.

10 La lecture du stade (3) permet d'apprécier la présence ou l'absence d'une réaction positive, la réaction positive se caractérisant notamment par :

15 - une coloration jaune visible à l'oeil nu due à la libération du reste chromogène préféré selon l'invention : H-pNA (ou coloration orangée due à la présence de la rhodamine), et

- un virage ou non du milieu en rose ou violet, selon l'espèce de Candida, dû à la réduction du TTC.

20 Selon l'invention, le milieu de culture pourra comporter un ou plusieurs substrats chromogènes.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture, qui va suivre, d'exemples de réalisation et d'essais comparatifs. L'ensemble de ces éléments n'est nullement limitatif mais est donné à titre d'illustration.

EXEMPLE 1

30 Suivant le meilleur mode de mise en oeuvre précité, on prépare un milieu de culture renfermant les ingrédients suivants, dénommé gélose 1 ci-après, tamponné à pH 6,0

YNB	6,7	g/l
Glucose	5,0	g/l
Agar	20	g/l
Gentamicine	0,04	g/l
35 Substrat chromogène	1	mM

EXEMPLE 2

Suivant le meilleur mode de mise en oeuvre précité, on prépare un milieu de culture renfermant les ingrédients suivants, dénommé gélose 2 ci-après, tamponné à pH 6,0

Sabouraud agar modifié (SM)	50	g/l
Gentamicine	0,05	g/l
Substrat chromogène	1	mM

EXEMPLE 3

Suivant le meilleur mode de mise en oeuvre précité, on prépare un milieu de culture renfermant les ingrédients suivants, dénommé gélose 3 ci-après, tamponné à pH 6,0

Sabouraud dextrose agar	65	g/l
Gentamicine	0,05	g/l
TTC	0,1	g/l
Cycloheximide	0,5	g/l
Substrat chromogène	1	mM

EXEMPLE 4

Suivant le meilleur mode de mise en oeuvre précité, on prépare un milieu de culture renfermant les ingrédients suivants, dénommé gélose 4 ci-après, tamponné à pH 6,0

YNB	6,7	g/l
Glucose	20	g/l
Agar	20	g/l
Gentamicine	0,05	g/l
Substrat chromogène	1	mM

EXEMPLE 5

Suivant le meilleur mode de mise en oeuvre précité, on prépare un milieu de culture renfermant les ingrédients suivants, dénommé gélose 5, ci-après tamponné à pH 6,0

	YNB	6,7 g/l
	Maltose	20 g/l
	Agar	20 g/l
5	Gentamicine	0,05 g/l
	Cycloheximide	0,5 g/l
	Substrat chromogène	1 mM

EXEMPLE 6

On a procédé à l'ensemencement et à l'incubation de plusieurs souches isolées de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.pseudotropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.zeilanoïdes*, *T.glabrata* et *Trichosporon cutaneum* sur les milieux des exemples 1 à 5. On a constaté que, avec le substrat H-Pro-pNA,AcOH, la gélose 5 est la plus appropriée vis-à-vis des souches de *Candida albicans*. Une partie des résultats obtenus a été consignée dans le tableau VI ci-après, où la colonne TTC fait état de résultats d'essais entrepris séparément sur un milieu gélosé standard contenant TTC. Ces résultats montrent l'intérêt de l'utilisation du cycloheximide pour rendre le substrat H-L-Pro-pNA,AcOH spécifique des souches de *Candida albicans*.

EXEMPLE 7

On a procédé à l'ensemencement et à l'incubation de plusieurs souches isolées de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii* et *T.glabrata* sur les milieux de l'exemple 2 [contenant soit le substrat de l'art antérieur N-Ac- β -D-galactosaminide-PNP, soit les substrats H-L-Pro-pNA,AcOH (spécifique de *C.albicans*), EM-L-Phg-L-Arg-pNA,AcOH (spécifique de *T.glabrata*) et H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,2AcOH (spécifique de *C.krusei*)] et de l'exemple 5 (contenant le substrat H-L-Pro-pNA,AcOH).

5 On a constaté que les substrats EM-L-Phg-L-Arg-pNA,AcOH et H-Gly-L-Pro-pNA,AcOH sont hydrolysés par les souches de *C.tropicalis*. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VII ci-après, où la colonne TTC fait état de résultats d'essais entrepris séparément sur un milieu gélosé standard contenant TTC.

TABLEAU VI

DIAGNOSTIC DE CANDIDA ALBICANS
(à partir de colonies isolées)
Lecture à t = 24 h

souches	n (a)	TTC	(1)	(2)	(3)
C.albicans	10	rose	++++	++++	++++
C.tropicalis	4	mauve	(d)	-	-
T.glabrata	4	(b)	-	-	-
C.krusei	4	(b)	-	-	-
C.guilliermondii	2	(c)	-	+++	-
C.zeylanoides	1	(c)	-	++	-
Tr.cutaneum	1	rose	++	+	-
C.parapsilosis	5	rose	-	+++	-
C.pseudotropicalis	2	rose	-	-	-
<p>Notes :</p> <p>(a) nombre de souches</p> <p>(b) blanc et faiblement rose dans un cas</p> <p>(c) blanc-rose</p> <p>(d) avec les 4 souches étudiées, 3 donnaient un résultat - et 1 un résultat +++</p> <p>(1) gélose 2 contenant le substrat N-Ac-β-D-galactosaminide-PNP</p> <p>(2) gélose 2 contenant le substrat H-L-Pro-pNA, AcOH</p> <p>(3) gélose 5 contenant le substrat H-L-Pro-pNA, AcOH</p>					

TABLEAU VII

DIAGNOSTIC DES PRINCIPAUX CANDIDA
 (à partir de colonies isolées)
 Lecture à t = 24 h

souches	n (a)	TTC	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
C.albicans	6	rose	+++	++++	-	-	++++
C.tropicalis	9	mauve	(c)	-	++	++	-
T.glabrata	9	(b)	-	-	+++	-	-
C.krusei	6	blanc	-	-	-	+++	-
<p>Notes :</p> <p>(a) nombre de souches</p> <p>(b) blanc-rose</p> <p>(c) lecture positive (++) pour 1 seule des 9 souches testées, négative pour les autres</p> <p>(1) gélose 2 contenant le substrat N-Ac-β-D-galactosaminide-PNP</p> <p>(2) gélose 2 contenant le substrat H-L-Pro-pNA, AcOH</p> <p>(3) gélose 2 contenant le substrat EM-L-Phg-L-Arg-pNA, AcOH spécifique de T.glabrata</p> <p>(4) gélose 2 contenant le substrat H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, 2AcOH spécifique de C.krusei</p> <p>(5) gélose 5 contenant le substrat H-L-Pro-pNA, AcOH et le cycloheximide</p>							

Les résultats du tableau VII montrent que l'on peut identifier en 24 h les quatre principales levures de *Candida* et de *Torulopsis* que l'on rencontre dans les cas pathologiques.

5

EXEMPLE 8

On a procédé à l'ensencement et à l'incubation d'un mélange de plusieurs souches non-isolées de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.pseudotropicalis*, *C.parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis glabrata* et *Trichosporon cutaneum* sur les milieux de culture, selon les exemples 1 à 5, contenant le substrat de l'art antérieur : N-Ac- β -D-galactosaminide-PNP, ou le substrat selon l'invention : H-Pro-pNA, AcOH. Les résultats, qui ont été notamment obtenus avec les géloses 2 et 5, sont consignés dans le tableau VIII ci-après, où la colonne TTC fait état de résultats d'essais entrepris séparément sur un milieu gélosé standard contenant TTC.

10

15

EXEMPLE 9

On a procédé à l'ensencement et à l'incubation d'un mélange de plusieurs souches non-isolées de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.pseudotropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.zeylanoides*, *C.ciferii*, *C.cerevisiae*, *Torulopsis glabrata* et *Trichosporon cutaneum* sur les milieux de culture, selon l'exemple 5, contenant le substrat antérieur : N-Ac- β -D-galactosaminide-PNP, ou le substrat selon l'invention : H-Pro-pNA, AcOH. Les résultats, qui ont été obtenus avec la gélose 5, ont été consignés dans le tableau IX ci-après, qui met en évidence l'intérêt de l'utilisation de l'inhibiteur, dans le cas d'espèce le cycloheximide, en association avec le maltose, où la colonne TTC fait état de résultats d'essais entrepris séparément sur un milieu gélosé standard contenant TTC.

20

25

30

TABLEAU VIII

DIAGNOSTIC DE CANDIDA ALBICANS
(à partir de colonies non-isolées)

Lecture à t = 24 h
(nombre total de souche : 35)

souches	n (a)	TTC	(1)	(2)	(3)
C.albicans	13	(b)	++++	++++	+++
T.glabrata	8	blanc	-	-	-
C.krusei	6	(c)	-	-	-
C.tropicalis	1	-	-	-	-
C.pseudotropicalis	1	rose	-	-	-
C.parapsilosis	2	rose	-	+++	-
Tr.cutaneum	2	(d)	(e)	++	-
Cr.neoformans	1	-	-	-	-
C.guilliermondii	1	(b)	-	+++	-
<p>Notes :</p> <p>(a) nombre de souches</p> <p>(b) blanc-mauve</p> <p>(c) pas de culture, sauf dans un cas une culture faible</p> <p>(d) blanc-rose</p> <p>(e) résultat - pour 1 souche et résultat +++ pour l'autre souche</p> <p>(1) gélose 2 contenant le substrat N-Ac-β-D-galactosaminide-PNP</p> <p>(2) gélose 2 contenant le substrat H-L-Pro-pNA,AcOH</p> <p>(3) gélose 5 contenant le substrat H-L-Pro-pNA,AcOH</p>					

TABLEAU IX

DIAGNOSTIC DE CANDIDA ALBICANS
(à partir de colonies non-isolées
et en présence de cycloheximide)

Lecture à t = 24 h

(nombre total de souche : 108)

souches	n (a)	TTC	(1)	(2)
C.albicans	89	(b)	++++(c)	++++
T.glabrata	8	blanc	-	-
C.krusei	1	rose	-	-
C.tropicalis	1	mauve	-	-
C.pseudotropicalis	2	-	-	-
C.parapsilosis	1	rose	-	-
Tr.cutaneum	2	rose	-	-
C.zeylanoides	1	(d)	-	-
C.guilliermondii	1	rose	-	-
C.ciferii	1	blanc	-	-
C.cerevisiae	1	-	-	-

Notes :

- (a) nombre de souches
- (b) rose pour 87 souches, mauve pour 2 souches
- (c) négatif pour 2 souches sur 89
- (d) rose-mauve
- (1) gélose 5 contenant le substrat
N-Ac- β -D-galactosaminide-PNP
- (2) gélose 5 contenant le substrat
H-L-Pro-pNA, AcOH

Selon l'invention, on préconise enfin un kit, nécessaire ou trousse de dosage comprenant au moins un milieu de culture contenant (i) le substrat préféré des souches de *Candida albicans*, le H-L-Pro-pNA ou l'un de ses sels d'addition d'acide et (ii) le cycloheximide, et le cas échéant, les substrats spécifiques des *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Torulopsis glabrata*, et si nécessaire des substrats spécifiques des autres *Candida* et *Torulopsis*.

Ledit milieu de culture sera avantageusement conditionné de façon à présenter le milieu nutritif (avantageusement du type solide gélosé) sous forme de boîtes de Pétri, de bandelettes (milieu nutritif déposé notamment par revêtement sur un support en papier ou en plastique), de tubes ou de plaquettes à godets ou cuvettes.

Le kit, nécessaire ou trousse de dosage, pourra également comporter des tampons de dilution.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un substrat chromogène pour la détermination de souches de Candida et de souches apparentées appartenant à l'ensemble des Torulopsis, ladite utilisation étant caractérisée en ce que ledit substrat chromogène est choisi parmi l'ensemble comprenant les substrats chromogènes sensibles aux aminoamidases ou aminopeptidases.

2. Utilisation suivant la revendication 1, caractérisée en ce que le substrat clivable par les aminoamidases et/ou les aminopeptidases des Candida et Torulopsis est choisi parmi l'ensemble constitué par

(i) les substrats chromogènes répondant à la formule



dans laquelle

R représente l'atome d'hydrogène ou un groupe bloquant l'extrémité N-terminale,

A_n représente une simple liaison, un reste monoaminoacide, ou un reste peptidique pouvant comporter de 2 à 5 restes aminoacides, avec la condition que A_n ne comporte aucun reste CHA ou CHT;

A_1 représente un reste α -aminoacide choisi parmi l'ensemble constitué par Gly, MeGly, L-Arg, L-Lys, L-His, L-Pro, L-Hyp, L-Cys, L-Val et L-Trp; et,

R^* représente un reste chromogène aminé notamment choisi parmi l'ensemble comprenant le reste p-nitroanilino et les reste p-nitroanilino où le groupe phényle est substitué; et,

(ii) leurs sels d'addition.

3. Utilisation suivant la revendication 2, caractérisée en ce que, quand

(a) A_n est une simple liaison, le substrat chromogène est choisi parmi l'ensemble constitué par

5 (i) les composés de formule



où R et R^* sont définis comme indiqué dans la revendication 2, et

A_1 est L-Pro, L-Hyp, L-Arg ou L-Lys, et

10 (ii) leurs sels d'addition;

(b) A_n est un reste monoaminoacide, le substrat chromogène est choisi parmi l'ensemble constitué par

(i) les composés de formule



15 où R et R^* sont définis comme indiqué dans la revendication 2,

A_1 est L-Pro, L-Hyp, L-Arg ou L-Lys, et

A_2 est Gly, L-Pro, L-Hyp, L-ONC, L-Phg ou L-ATC, et

20 (ii) leurs sels d'addition;

(c) A_n est un reste dipeptidique, le substrat chromogène est choisi parmi l'ensemble constitué par

(i) les composés de formule



25 où R et R^* sont définis comme indiqué dans la revendication 2,

A_1 est L-Pro, L-Hyp, L-Arg ou L-Lys,

A_2 est Gly, L-Pro, L-Hyp, L-ONC, L-Phg ou L-ATC, et

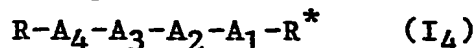
30 A_3 est Gly, D-Pro, L-Pro, D-Hyp, L-Hyp, D-Leu, L-Leu, D-Ala, L-Ala, D-Val, L-Val, D-ONC, L-ONC ou INC, et

(ii) leurs sels d'addition; et

(d) A_n est un reste tripeptidique, le substrat chromogène est choisi parmi l'ensemble constitué par

35

(i) les composés de formule



où R et R* sont définis comme indiqué dans la revendication 2,

5

A₁ est L-Pro, L-Hyp, L-Arg ou L-Lys,

A₂ est Gly, L-Pro, L-Hyp, L-ONC, L-Phg ou L-ATC, L-Thr,

A₃ est Gly, L-Pro, L-Hyp, L-Leu, L-Ser, L-Ala ou L-Val, et

10

A₄ est Gly, D-Pro, L-Pro, D-Hyp, L-Hyp, D-Leu, L-Leu, D-Ala, L-Ala, D-Val, L-Val, D-ONC, L-ONC ou INC, et

(ii) leurs sels d'addition.

15 4. Utilisation suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que pour la détermination des souches de Candida et de Torulopsis l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par

20

(a) H-L-Pro-pNA,

(b) H-L-Hyp-pNA,

(c) H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,

(d) Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,

(e) H-L-4Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA,

25

(f) Boc-L-4Hyp-L-Pro-L-Arg-pNA, et

(g) leurs sels d'addition.

5. Utilisation suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que

30

(a) pour la détermination des souches de C.albicans l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble des composés de formule I₁ où R* est pNA, A₁ est L-Pro ou L-Hyp, et R est H, et leurs sels d'addition, en présence de cycloheximide,

(b) pour la détermination des souches de *T.glabrata* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formule I_2 ou I_3 , où R^* est pNA, A_1 est L-Arg, A_2 est L-Pro ou L-Phg, A_2 est Gly et R est différent de H, et leurs sels d'addition;

(c) pour la détermination des souches de *C.krusei* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formule I_3 où R^* est pNA, A_1 est L-Arg, A_2 est L-Pro, A_3 est Gly, et R est H, EM ou MM, et leurs sels d'addition;

(d) pour la détermination des souches de *C.guilliermondii* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés :

H-L-Pro-pNA,
H-L-Arg-pNA,
H-L-ONC-L-Arg-pNA,
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,
Boc-L-Leu-L-Ser-L-Thr-L-Arg-pNA, et
leurs sels d'addition;

(e) pour la détermination des souches de *C.tropicalis* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés de formules I_1 , I_2 , I_3 et I_4 où R^* est pNA, A_1 , A_2 , A_3 et A_4 sont définis comme indiqué dans la revendication 3, et R est différent de H, et leurs sels d'addition.

6. Procédé pour l'identification de levures appartenant à l'ensemble des souches de *Candida* et des souches apparentées de *Torulopsis*, ledit procédé étant caractérisé en ce que

(a) on met en contact un échantillon de levures avec (i) au moins un substrat chromogène sensible à au moins un enzyme appartenant à l'ensemble des aminoamidases et aminopeptidases, et (ii) au moins un moyen inhibiteur choisi parmi l'ensemble comprenant notamment les

substances antibactériennes, les substances antifongiques et leurs mélanges, en présence d'une source d'azote, d'une source de carbone et, le cas échéant, d'oligoéléments, et.

- 5 (b) on incube puis observe pendant au moins 1 h la cinétique du clivage dudit substrat par la formation de couleur résultant dudit clivage.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le substrat chromogène est une substance telle que

(A) pour l'identification des souches de *Candida albicans*, l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par :

- 15 (a) les composés de formule



où R^* est pNA, R est H et A_1 est L-Pro ou L-Hyp, et

(b) leurs sels d'addition;

- 20 (B) pour l'identification des souches de *T. glabrata* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par (a) les composés de formule I_2 ou I_3 selon la revendication 3, où R^* est pNA, A_1 est L-Arg, A_2 est L-Pro ou L-Phg, A_3 est Gly et R est différent de H, et

- 25 (b) leurs sels d'addition;

(C) pour l'identification des souches de *C. krusei* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par (a) les composés de formule I_3 selon la revendication 3, où R^* est pNA, A_1 est L-Arg, A_2 est L-Pro, A_3 est Gly, et R est H, EM ou MM, et (b) leurs sels d'addition;

- 30 (D) pour l'identification des souches de *C. guilliermondii* l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble constitué par les composés :

H-L-Pro-pNA,
H-L-Arg-pNA
H-L-ONC-L-Arg-pNA,
Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,
5 Boc-L-Leu-L-Ser-L-Thr-L-Arg-pNA, et
leurs sels d'addition; et,

(E) pour l'identification des souches de *C. tropicalis*
l'on fait appel à un substrat choisi parmi l'ensemble
constitué par (a) les composés de formules I_1 , I_2 , I_3 et
10 I_4 selon la revendication 3, où R^* est pNA, A_1 , A_2 , A_3
et A_4 sont définis comme indiqué dans la revendication 3
et R est différent de H, et (b) leurs sels d'addition.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel

15 (A) le substrat pour l'identification des souches de
Candida albicans est choisi parmi le composé H-L-Pro-pNA
et ses sels d'addition;

(B) le substrat pour l'identification des souches de
Torulopsis glabrata est choisi parmi l'ensemble
20 constitué par les composés EM-L-Phg-L-Arg-pNA, MM-L-Phg-
L-Arg-pNA et leurs sels d'addition;

(C) le substrat pour l'identification des souches de
Candida krusei est choisi parmi l'ensemble constitué par
H-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA,
25 MM-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA, et

leurs sels d'addition;

(D) le substrat pour l'identification des souches de
Candida guilliermondii est choisi parmi le composé de
formule :

30 Boc-L-Leu-L-Ser-L-Thr-L-Arg-pNA,
et ses sels d'addition; et,

(E) le substrat pour l'identification des souches de
Candida tropicalis est choisi parmi l'ensemble compre-
nant :

H-L-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA,
H-D-Pro-L-Pro-L-Arg-pNA,
H-D-Leu-Gly-L-Arg-pNA,
H-L-Leu-Gly-L-Arg-pNA, et
5 leurs sels d'addition.

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on incube sur un milieu liquide à un pH de 6 à 8 supérieur ou égal à 4,5 et mieux compris entre 6,0 et 8,0 et observe, pendant au moins 1 h, la cinétique du
10 clivage dudit substrat.

10. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on incube sur un milieu solide gélosé à un pH de 6 à 8 supérieur ou égal à 4,5 et mieux compris entre 6,0 et 8,0 et observe, pendant au moins 12 h, la cinétique du clivage dudit substrat.
15

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7, 8 et 10, caractérisé en ce que ledit milieu de culture est solide et contient :
20

- (1) de 4 à 15 g/l de peptone;
- (2) de 10 à 40 g/l d'un sucre notamment choisi parmi l'ensemble constitué par le glucose et le maltose;
- (3) de 10 à 30 g/l d'agar;
- 25 (4) de 0,5 à 2 mM d'au moins un substrat chromogène.

12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que ledit milieu de culture contient en outre :
30

- (5) de 0,1 à 0,5 g/l de cycloheximide ou d'un moyen équivalent inhibant la pousse des levures comprenant notamment les *Torulopsis* et les *Candida* différents de *Candida albicans*, et susceptibles d'interférer dans l'identification de *Candida albicans*.

13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 6 à 12, caractérisé en ce que l'incubation est réalisée à une température comprise entre 15°C et 40°C.
- 5 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 6 à 13, destiné à l'identification de souches de *Candida albicans* isolées ou non isolées.
- 10 15. Nécessaire d'identification caractérisé en ce qu'il renferme au moins un substrat chromogène utile selon le procédé des revendications 7 et 8.

2659982

**N° d'enregistrement
national**

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

**établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche**

FR 9003726
FA 441017

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US-A-4 874 695 (D.H. PINCUS) * Revendications *	1,2
Y		3,4
A		9,13-15
Y	EP-A-0 255 341 (SUNSTAR K.K.) * Résumé *	3,4
A	EP-A-0 173 944 (MILES LAB. INC.) * Revendications *	5,6
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> C 12 Q </div>
Date d'achèvement de la recherche 05-12-1990		Examineur MERLU B.H.A.
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul</p> <p>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</p> <p>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général</p> <p>O : divulgation non-écrite</p> <p>P : document intercalaire</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention</p> <p>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.</p> <p>D : cité dans la demande</p> <p>L : cité pour d'autres raisons</p> <p>-----</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p> </div> </div>		